



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554825_0060

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke
der Universität München

Direktor: Prof.Dr. H.H.Naumann

ZUM SEKRETIONSVERHALTEN VON PHOSPHATASEN UND PHOSPHOPROTEINEN
IN FRAKTIONIERT GEWONNENEN RUHE- UND REIZSEKRET GESUNDER
MENSCHLICHER PAROTIS- UND SUBMANDIBULARISDRÜSEN.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Herrn Georg Mair

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr. H. Eichner
Mitberichterstatter: Prof.Dr.H.H. Naumann
Dekan: Prof.Dr.W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.10.1985

Dank sagen möchte ich Herrn Professor Dr.H.H.Naumann
für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes,

Herrn Professor Dr.H. Eichner danke ich ganz herzlichst
für die jederzeit freundliche und bereitwillige Unter-
stützung und die vielen anregenden Vorschläge im
Rahmen meiner Arbeit.

Ebenso darf ich Herrn Professor Dr. Karl Hochstrasser
danken für die technischen Hinweise und die Arbeits-
möglichkeit im Forschungslaboratorium der Hals-, Nasen-
Ohrenklinik.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	
zur Funktion der Speicheldrüsen	1
II. Theoretische Grundlagen	
1. Sekretgewinnungsmöglichkeiten	4
2. Gesamtproteinbestimmung	
3. Diskelektrophorese	5
4. Gesamtproteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue	7
5. Selektivfärbung für Phosphoproteine, modifiziert nach Cutting und Roth	8
6. Bestimmung der sauren Phosphatase	8
III. Experimenteller Teil	
1. Sekretabnahme, Bestimmung der Flußraten	9
2. Durchführung der Biuret-Probe	10
3. Durchführung der Diskelektrophorese	11
4. Durchführung der Coomassie-Färbung	13
5. Durchführung der Phosphoproteinfärbung	14
6. Bestimmung der sauren Phosphatasen	16
IV. Ergebnisse	
A. Glandula parotis	
1. Flußraten	17
2. Gesamt-Proteinausscheidung	20
3. Saure Phosphatase	20
4. Diskelektrophoretische Auftrennung	25
B. Glandula submandibularis	
1. Flußraten	31
2. Proteinausscheidung	34
3. Saure Phosphatase	34
4. Diskelektrophoretische Auftrennung	37
V. Diskussion	42
VI. Zusammenfassung	45
Literatur	
Lebenslauf	

I. Einleitung

Während man sich über Entwicklungsgeschichte, Anatomie und Physiologie der menschlichen Speicheldrüsen auf umfangreiche und erschöpfende Arbeiten beziehen kann, erscheint es weit schwieriger, deren verschiedenartige Funktionen in ihrer Gesamtheit zu erfassen. Als Kontaktregion zur Außenwelt ist die Mundhöhle die erste Verteidigungslinie im Umgang mit Schadstoffen und Erregern. Selbst unter gesunden und physiologischen Bedingungen kommt dieser Region daher eine hohe Aufgabe in der sowohl mechanischen als auch biochemischen Abwehrbarriere zu. Dabei spielt der Speichel in der Mundhöhle mit die Hauptrolle. Lysozym und Immunglobulin A üben eine bakterizide und bakteriolytische Wirkung z.B. auf hämolysierende Streptokokken, Staphylokokken und Tuberkulosebakterien aus. Dabei freiwerdende Bakterienproteasen werden durch säurestabile niedermolekulare Proteaseinhibitoren (Hochstrasser u.a.) inaktiviert und an ihrer schleimhautschädigenden Wirkung gehindert. HANSON führt eine spezifische auch gegen Viren wirksame Infektionsabwehrfunktion auf Sialomucine zurück, die bestimmte Stellen der Oberfläche von Mikroorganismen besetzen. Diese sialinsäurehaltigen Partien können dann nicht mehr mit der Oberfläche körpereigener Zellen reagieren. So wird z.B. die von Influenzaviren auf Erythrozyten ausgeübte Agglutinationswirkung durch Sialomucinzusatz gehemmt.

Neben der immunologischen Abwehrfunktion des Speichels kommt ihm als dem ersten Organ des Verdauungskanals eine digestive Bedeutung zu.

Dabei ist zu unterscheiden zwischen Funktionen physikalisch-mechanischer Natur einerseits und chemischen bzw. enzymatischen Wirkungen andererseits. So werden den kleinen Speicheldrüsen Schleimhautschutzfunktionen zugesprochen, während die Sublingual- und Submandibulardrüsen, die ebenfalls ein gemischtes Sekret ausscheiden, die Speisen gleitfähig machen. Die Parotis, deren seröses Sekret bei mechanischer Reizung mehr als die Hälfte des Gesamtspeichels bildet, ermöglicht mit ihrem serösen Sekret die Verflüssigung der aufgenommenen Nahrung. Außerdem kommt ihr durch Pufferung und Verdünnung aggressiver Substanzen eine Schutzfunktion zu. Die enzymatische Aufbereitung der Nahrung wird vor allem durch die im Speichel reichlich vorkommende Amylase gewährleistet, die mit einem Anteil von 40% am Gesamtprotein das Hauptprotein des Parotissekretes bildet.

Aus dieser naheliegenden digestiven Wirkung scheint der Speichel auch humorale Wirkung zu haben. SECKER und FELDBERG zeigten erstmals eine blutdrucksenkende Wirkung intravenös applizierten Speichels, die dann von WERLE und RODEN als Kallikreinwirkung identifiziert wurde.

Eine weitere wichtige Funktion des Speichels ist seine dentotrope Wirkung. Während der Metabolismus des Dentins vom Blut aus erfolgt, werden die Stoffwechselvorgänge des Zahnschmelzes fast ausschließlich vom Speichel beeinflusst. Diese Tatsache wird anschaulich durch das rasche Zugrundegehen der Zähne bei einem Ausfall der Speicheldrüsenfunktion, z.B. bei postaktinischen Sklerosen nach Röntgenbestrahlung maligner Tumoren in der Mundhöhle.

Eine wichtige Aufgabe im Zahnschmelzstoffwechsel erfüllen daher Phosphor und Calcium. Mißt man jedoch die Phosphatausscheidung der menschlichen Speicheldrüsen, so zeigt sich, daß bei einer Sekretion von 1500 ml Speichel pro Tag etwa 25 % des Gesamtphosphatbedarfs des Körpers im Speichel sezerniert werden (EGGERS und LURA). Es kommt deshalb diesen Phosphaten und im Gefolge den Phosphatasen neben ihrer lokalen Bedeutung für Zahnschmelz und Mundschleimhaut sicherlich auch eine Rolle im gesamten Verdauungsvorgang zu. Weitere Untersuchungen von EGGERS und LURA ergaben, daß die organische Phosphatfraktion des Speichels Kreatinphosphat, Adenosintriphosphat, Hexosephosphat und Phosphodiglyzerat enthält, Phosphate, die bekanntlich als energiereiche Phosphate die Energielieferanten des Zellstoffwechsels darstellen. Dagegen ist noch wenig bekannt über phosphorilierte Proteine im Sekret der Speicheldrüsen, über deren Aufgaben, Ausscheidungsverhalten und Beziehung zu den Phosphatasen.

Aus diesem Grunde sollte in der vorliegenden Arbeit der Umsatz und die Ausscheidungsrate der Phosphatasen sowie der Phosphoproteine untersucht werden.

II. Theoretische Grundlagen

1. Sekretgewinnungsmethoden

In der Literatur (RAUCH) werden im wesentlichen zwei Parotisssekretgewinnungsmethoden angegeben, einmal die Abnahme mittels der Lashley-Cup und zum anderen durch direkte Sondierung des Parotisausführungsganges mittels Kunststoffkathetern.

Da das Einbringen der Lashley-Cup eine mechanische Irritation der Mundhöhle darstellt und damit auf die Speichelsekretion Einfluß nimmt, wurde die zweite Art der Abnahme mittels Kunststoffkathetern gewählt.

2. Gesamtproteinbestimmung:

Als quantitativer Nachweis für Peptide und Proteine, nicht aber Aminosäuren, wurde die Biuret-Methode angewandt.

Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer Zuverlässigkeit und in ihrer Reproduzierbarkeit.

Prinzip der Methode:

Peptide und Proteine bilden mit Kupfer-II-Salzen in alkalischer Lösung intensiv rot bis violett gefärbte Komplexverbindungen. Diese Komplexe entstehen durch Zusammenschluß von jeweils einem Atom Kupfer mit vier Peptidstickstoffen. Die Reaktion ist nicht reversibel, der Kupfer-Peptid-Komplex ist in alkalischer Lösung stabil.

3. Diskelektrophorese

Theorie der Diskelektrophorese nach MAURER:
Dem Prinzip der Diskelektrophorese liegt ein diskontinuierliches Trennsystem zugrunde. Diese Diskontinuität, die durch Pufferpaare unterschiedlicher pH-Werte gegeben ist, erzeugt vor der eigentlichen Auftrennung der Proteinfractionen zunächst schmale und damit konzentrierte Startzonen. Dabei wird gerade bei niedriger Eiweißkonzentration der aufgetragenen Substanzen eine scharfe Trennung erreicht.

Eine entscheidende Bedeutung für die Leistungsfähigkeit dieses Trennverfahrens kommt aber auch den physikalischen Eigenschaften der Trägersubstanz, des Polycrylamids, zu. Dabei handelt es sich um ein Polymerisations- und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid und einem Vernetzungsfaktor, dem N,N'-Methylenbisacrylamid. Die zur Kopolymerisation nötigen freien Radikale werden durch das Katalysator-Redoxsystem Ammoniumperoxodisulfat-Temed (N,N,N',N'-Tetramethylathyldiamin) geliefert. Nach Art der Vinyl-Polymerisation entstehen also zunächst Polyacrylamidketten, diese vernetzen untereinander zu knäuelförmigen Untereinheiten, die im weiteren Verlauf der Reaktion zusammenrücken und, analog den Polyacrylamidketten, miteinander vernetzen. Das so entstehende dreidimensionale Maschenwerk, das Gel, hat gegenüber flüssigen Medien eine wesentlich höhere Viskosität. Deshalb erfahren Teilchen, die darin wandern, einen je nach ihrer Oberfläche verschiedenen Reibewiderstand. Sie lassen sich deshalb nicht nur nach ihrer Ladung, sondern auch nach ihrer

Molekülgröße und Molekülgestalt trennen. Dieser Molekularsieb-Effekt ist besonders dann wichtig, wenn Proteine gleicher Ladung, doch unterschiedlicher Größe aufzulösen sind, die durch trägerfreie Elektrophorese nicht aufzutrennen wären.

Für das im Vergleich zur Papier- und Zelloseazetatelektrophorese wesentlich höhere Auflösungsvermögen sind also zwei physikalische Effekte verantwortlich:

- der Konzentrierungseffekt durch die pH-Diskontinuität;
- der Molekularsieb-Effekt durch das dreidimensionale Maschenwerk der Träger-substanz.

Zur Auftrennung von Speichel eignet sich nach bisherigen Erfahrungen (EICHNER) am besten ein 7,5 %iges Acrylamid-Mittelporgel bei pH 8,8.

Entsprechend den Angaben von MAURER trennt dieses Gel Proteingemische mit Molekulargewichten von 10^4 bis 10^6 auf, der optimale Trennbereich liegt bei 3 mal 10^4 bis 10^5 .

4. Gesamtproteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

Diese Färbung, bei der sämtliche Eiweißfraktionen dargestellt werden, wurde routinemäßig bei den Sekreten sämtlicher Probanden durchgeführt. Somit ergab sich die Möglichkeit, Vergleiche mit selektiven Färbungen anzustellen.

Prinzip:

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue reagiert in schwach saurem Milieu mit den positiven NH_3 -Gruppen der Proteine. Die Bindung wird hergestellt durch elektrostatische und Van-der-Waal'sche Kräfte und ist deshalb reversibel. Gegenüber vergleichbaren Farbstoffen wie Amidoschwarz, Bromphenolblau oder Azocarmin zeichnet sich Coomassie durch höhere Empfindlichkeit aus. Für quantitative Proteinbestimmungen vorteilhaft ist auch die große Gleichmäßigkeit der Bindung an verschiedene Proteine.

5. Selektivfärbung für Phosphoproteine,
modifiziert nach Cutting und Roth

Prinzip:

Nach Fixieren und Herauslösen von anorganischem Phosphat aus dem Gel werden mit Hilfe von Natronlauge die Phosphoesterbindungen der Phosphoproteine hydrolytisch gespalten. Mit den im Gel anwesenden Calciumionen bildet sich unlösliches Calciumphosphat. Durch Salpetersäure unter Anwesenheit von Ammoniummolybdat wird das Phosphat aus der Bindung mit Calcium freigesetzt und in einen Nitrophosphomolybdatkomplex überführt, der dann mit Methylgrün angefärbt werden kann.

6. Bestimmung der sauren Phosphatase

Prinzip:

Durch Spaltung des Substrats p-Nitrophenylphosphat wird p-Nitrophenol gebildet. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Natronlauge gestoppt, dabei wird gleichzeitig das freigesetzte p-Nitrophenol in das gelb gefärbte Anion übergeführt. Die Intensität der Gelbfärbung kann dann spektralphotometrisch bestimmt werden. Nach enzymkinetischem Prinzip ist die Menge des in der Zeiteinheit freigesetzten p-Nitrophenols der Enzymaktivität direkt proportional. Der tartratstabile Teil der sauren Phosphatase kann unter Zusatz von Tartrat bestimmt werden.

III. Experimenteller Teil

1a Patientengut und Sekretgewinnung

Zur Untersuchung gelangte ein Normalkollektiv von 44 männlichen und weiblichen Patienten im Alter von 18 - 50 Jahren, die meist wegen plastischer Operationen stationär aufgenommen worden waren. Die Speicheluntersuchungen wurden präoperativ durchgeführt.

Stoffwechselkrankheiten und hormonelle Störungen, die möglicherweise Sekretveränderungen der Speicheldrüsen verursachen, wurden anamnestisch und durch Serumkontrolluntersuchungen ausgeschlossen. Da die einzelnen sezernierten Stoffe starken Zirkadianschwankungen unterliegen, wurde die Sekretabnahme stets zwischen 9 und 11 Uhr durchgeführt.

Auch erhielten alle Probanden die gleiche klinische übliche Verpflegung, so daß man von standardisierten Bedingungen der Sekretgewinnung ausgehen durfte.

III. Experimenteller Teil =====

1b Sekretabnahme, Bestimmung der Flußraten

In den Ductus parotideus wurde nach Sondierung ein Polyvinylkatheter mit einem Gesamtdurchmesser von 1 mm und einem inneren Durchmesser von 0,5 mm eingeführt. Das abtropfende Sekret wurde mit Hilfe eines Fraktionsteilers in zehnminütigen Fraktionen in graduierten Reagenzgläsern gesammelt. Um eine Beeinflussung der Sekretzusammensetzung durch die unvermeidliche mechanische Reizung der Drüsenausführungsgänge zu vermeiden, wurde die erste Fraktion verworfen.

Die Abnahme der nächsten drei Fraktionen erfolgte unter Ruhebedingungen. Anschließend erhielt ein Teil der Probanden über einen Zeitraum von 30 Minuten Ascorbinsäure peroral in Form von Lutschtabletten (Cebion 100 mg), bei den anderen Probanden wurde die Speichelsekretion durch eine einmalige subcutane Injektion von Pilocarpin (0,075 mg/kg Körpergewicht) stimuliert. Die Proben wurden während der gesamten Abnahme in Eiswasser gekühlt und anschließend sofort aufgearbeitet.

2. Durchführung der Biuret-Probe

a) Bereitung von Biuret-Reagens:

- Lösen von 9 g Natrium-Kaliumtartrat in 400 ml 0,2 n Natronlauge
- Zusetzen von 3 g Kupfersulfat
- Nach Lösung Zugabe von 5 g Kaliumjodid und Auffüllen der Lösung mit 0,2 n Natronlauge auf 1000 ml

b) Erstellen einer Eichkurve:

- Dialysieren und Lyophilisieren von Parotissekret
- Herstellen einer Eichlösung von 20 mg/ml, Einsetzen verschiedener Konzentrationen ab 0,5 mg
- Messen der jeweiligen Extinktion im Eppendorf-Photometer bei 546 nm

c) Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Speichelproben durch Extinktionsvergleich mit der Eichkurve

3. Durchführung der Diskelektrophorese

Zur Herstellung der Gele werden drei verschiedene Lösungen benötigt:

Lösung 1: 48 ml 1 N HCL
36,6 g Tris
0,8 g Temed

Lösung 2: 30,0 g Acrylamid
0,8 g Bisacrylamid

Lösung 3: 60 mg Ammoniumperoxodisulfat

Die aufgeführten Bestandteile beziehen sich jeweils auf 100 ml der jeweiligen Lösung. Die Lösungen 1 und 2 sind bei +4°C einen Monat haltbar. Lösung 3 muß vor Gebrauch frisch angesetzt werden.

Herstellung der Gele und Ausführung der Diskelektrophorese:

a) Die oben beschriebenen Lösungen werden in folgendem Verhältnis gemischt:

ein Teil Lösung 1
zwei Teile Lösung 2
ein Teil H₂O
vier Teile Lösung 3.

b) Mit diesem Reaktionsgemisch werden nun standardisierte Glasröhrchen von 120 mm Länge und einem Innendurchmesser von 5 mm bis zur 100 mm-Markierung aufgefüllt. Die Oberflächen dieser polymerisierenden Gele werden mit 3 mm aqua dest. überschichtet, um Luftzutritt zu verhindern.

- c) Nach einer Stunde ist die Polymerisation erfolgt, das Wasser wird abgesaugt und die Glasröhrchen mit den Gelen werden in den Elektrophoreseapparat eingebracht. Nun wird der Nativspeichel aufgetragen.
- d) Als Elektrodenpuffer wird eine Tris-Glycin-Lösung von pH 8,4 (Stammlösung: 6 g Tris, 28,8 g Glycin/1000 ml; zum Gebrauch: 1:10 mit aqua dest.) in beide Elektrophoresekammern eingebracht. Der Lauf der zu trennenden Speichelproteine erfolgt von der Kathode zur Anode, da es sich um ein anionisches Gelsystem handelt. Um die vorderste Front der im Gel wandernden Substanzen sichtbar zu machen, kann man dem Puffer in der Kathodenkammer ca. 0,5 ml 0,001 %ige Thymolblaulösung zugeben.
- e) Nach einem Vorlauf von 10 Minuten bei 0,2 m A pro Gel, währenddessen sich die aufzutrennende Substanz an der Geloberfläche konzentriert, erfolgt der Hauptlauf über 120 Minuten bei 0,5 m A pro Gel. Die konstante Stromstärke liefert ein Netzgerät, das durch eine variable Spannung Widerstandsänderungen auf Grund von Temperaturschwankungen in Gel und Elektrodenpuffer ausgleicht.

f) Nach der Normallaufzeit haben die Indikatorfronten die anodennahen Enden der Gele erreicht, und diese können nun durch Umspritzen mit einem Glycerin-Wasser-Gemisch aus den Glasröhrchen entfernt werden.

Um ein Auseinanderdiffundieren der aufgetrennten Fraktionen im Gel zu verhindern, muß an die Elektrophorese sofort das Fixieren und Färben der Proteine anschließen.

4. Durchführung der Coomassie-Färbung

a) Denaturierung und Fixierung der Eiweißfraktionen im Gel durch 10 %ige Trichlor-essigsäure für 30 Minuten.

b) Anfärben der Gele in einer Lösung aus 1 Teil 1 %iger wässriger Coomassie-Lösung und 9 Teilen 10 %iger Trichlor-essigsäure über 12 Stunden.

c) Auswaschen der überschüssigen Farbe aus den proteinfreien Gelanteilen in 7 %iger Essigsäure. Mehrfaches Wechseln der Essigsäure innerhalb ca. 48 Stunden.

d) Aufbewahren der Gele in 7 %iger Essigsäure.

5. Durchführung der Phosphoproteinfärbung

- a) Fixieren der aufgetrennten Proteine in 10 %iger Sulfosalicylsäure (SSA) für 30 Minuten. Anorganisches Phosphat wird gleichzeitig aus dem Gel herausgelöst.
- b) Inkubieren mit einer 0,5-molaren Lösung von CaCl_2 in 10 %iger SSA über 60 Minuten.
- c) Sorgfältiges, mehrfaches Spülen der Gele in aqua dest. An der Oberfläche der Gele verbliebenes CaCl_2 würde beim nächsten Schritt einen Niederschlag und im weiteren Verlauf eine diffuse Färbung zur Folge haben.
- d) Hydrolyse in 0,5-normaler Natronlauge bei 60°C für 30 Minuten.
- e) Inkubieren über zweimal 10 Minuten mit 1 %iger wässriger Ammoniummolybdatlösung.
- f) Bildung des Nitro-phospho-molybdat-Komplexes durch eine 1 % Ammoniummolybdatlösung in 2-normaler Salpetersäure über 30 Minuten.
- g) Färben in 0,5 % Methylgrünlösung in 7 %iger Essigsäure über 30 Minuten.

- h) Auswaschen der überschüssigen Farbe aus den bandenfreien Gelbereichen durch 10 %ige SSA. Diese wird innerhalb von 48 Stunden mehrmals gewechselt.
- i) Aufbewahren der Gele in 7 %iger Essigsäure. Durch Zusatz von Glycerin kann ein Schrumpfen der Gele verhindert werden.

6. Bestimmung der sauren Phosphatasen

Reagentien:

50 mM Citronensäure-Citratpuffer pH 4,8
5,5 mM p-Nitrophenylphosphatlösung
0,2 M Natriumtartratlösung
0,02 Natronlauge
1 ml Puffer-Substrat-Lösung

Das Sekret jedes Probanden wird mit und ohne Tartratzusatz getestet.

Ausführung:

- a) Inkubieren von 1 ml Puffer-Substrat-Lösung, gegebenenfalls 0,1 ml Tartratlösung mit 0,2 ml Nativspeichel bei 37° C.
- b) Stoppen der Reaktion nach 30 Minuten durch Zugabe von 10 ml Natronlauge.
- c) Ablesen der Extinktion der Analyse gegen eine Blindprobe im Eppendorf-Photometer bei 405 nm.

IV. Ergebnisse

=====

A. Glandula parotis

1. Flußraten

Die Ruhesekretion lag bei den untersuchten Personen bei 0,02 bis 0,20 ml/min./Drüse. Bei Stimulation fand sich ein für die Reizart charakteristisches Verhalten der Flußraten.

So kam es bei Ascorbinsäurestimulation zu einer plateauartigen Zunahme auf 0,20 bis 0,50 ml/min./Drüse. Nach dem Absetzen der Ascorbingabe stellten sich rasch wieder die Ausgangswerte ein. (Abb. 1).

Die Injektion von Pilocarpin führte ebenfalls zu einer Sekretionssteigerung, die Maximalwerte lagen bei 0,4 bis 0,8 ml/min./Drüse. Die Ausscheidungskurven waren nicht plateauartig, sondern zeigten ca. 20 Minuten nach der Injektion Flußratengipfel. Nach deren Erreichen kam es dann zu einem kontinuierlichen Abfall bis schließlich die Basissekretionswerte erreicht wurden. (Abb. 2).

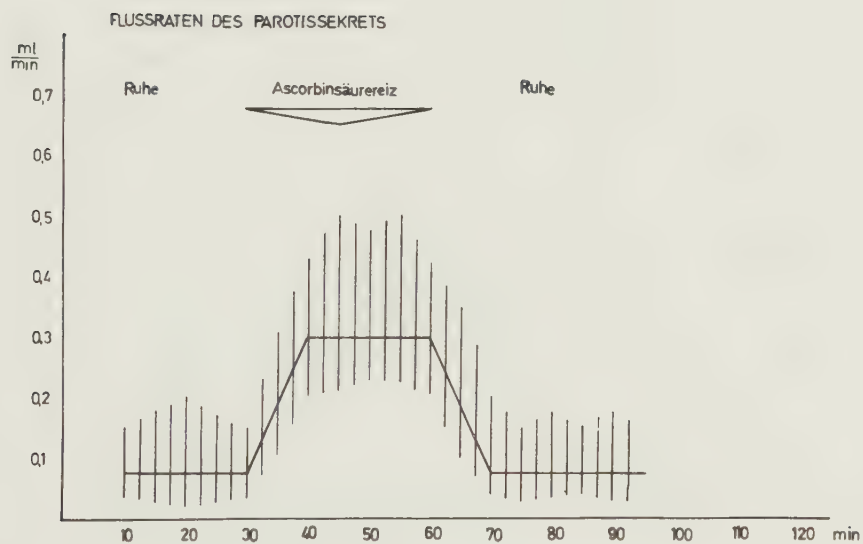


Abb. 1

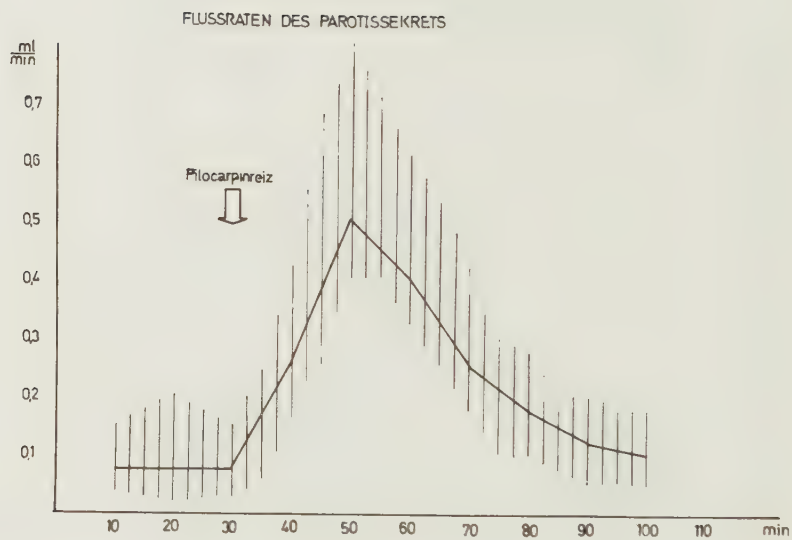


Abb. 2

2. Gesamt-Proteinausscheidung

Die Proteinkonzentrationen der Ruhesekrete lagen zwischen 0,8 und 5 mg/ml.

Die Reaktion der Drüsen bei Stimulation war uneinheitlich, es war aber doch bei Ascorbinsäurereiz eine Tendenz zur Konzentrationsabnahme festzustellen, während bei Pilocarpinreiz die überwiegende Zahl der Drüsen einen Konzentrationsanstieg zeigten. Es wurden Werte bis 8 mg/ml erreicht.

3. Saure Phosphatase

Die Konzentration der tartrathemmbar sauren Phosphatase, deren Anteil an der sauren Phosphataseaktivität im Sekret der Speicheldrüsen der weitaus größte ist, schwankte unter Ruhebedingungen zwischen 5 und 12 mU/ml.

Auf Ascorbinsäurereiz stiegen die Konzentrationen fast einheitlich an, es wurden Werte zwischen 10 und 20 mU/ml erreicht.

Für die Dauer des Reizes änderten sich die Konzentrationen nur wenig, es ergaben sich also keine Anzeichen für Erschöpfung der Drüsen unter anhaltenden Reizbedingungen. (Abb. 3).

Nach Pilocarpinreiz zeigten die Drüsen ein weniger einheitliches Verhalten. In etwa einem Drittel der Fälle kam es zu einer mäßigen Konzentrationsabnahme,

bei den restlichen zwei Drittel jedoch stieg die Konzentration auf Werte bis 25 mU/ml.

Unter Berücksichtigung der Flußraten ergab sich damit auch bei Pilocarpinstimulation stets eine Steigerung der Gesamtausscheidung an tartrathemmbarer saurer Phosphatase. (Abb. 4).

Der Anteil der tartratstabilen sauren Phosphatase bei Ruhe betrug zwischen 5 und 15 % der gesamten sauren Phosphataseaktivität. Die Reaktion auf Reiz erfolgte analog dem jeweiligen Verhalten der Gesamtposphatasekonzentration.

Zur Beurteilung der vorliegenden Phosphatase-Werte erscheint es wichtig, auf die sehr geringe Stabilität der sauren Phosphatasen (WEISS) hinzuweisen. So zeigte es sich als unerläßlich, bereits während der Sekretgewinnung die Reagenzgläser in Eis zu kühlen, diese sofort nach Beendigung der jeweiligen Fraktionsintervalle von 10 Minuten luftdicht zu verschließen und das gewonnene Material unmittelbar nach der Sekretabnahme zu verarbeiten.

Bereits nach 1 Stunde Aufbewahrung bei Zimmertemperatur waren reduzierte Enzymaktivitäten festzustellen. Dabei zeigten gerade die unter Reiz gewonnenen Sekretproben einen weit höheren Abfall ihrer Phosphatasenaktivität als die Ruhesekrete.

Bei Vergleichsmessungen, die mehrere Stunden nach der Speichelabnahme durchgeführt wurden, ergaben sich dann häufig gegenüber der ersten Messung umgekehrte Relationen bezüglich der Phosphatasenaktivitäten von Ruhe- und Reizsekret.

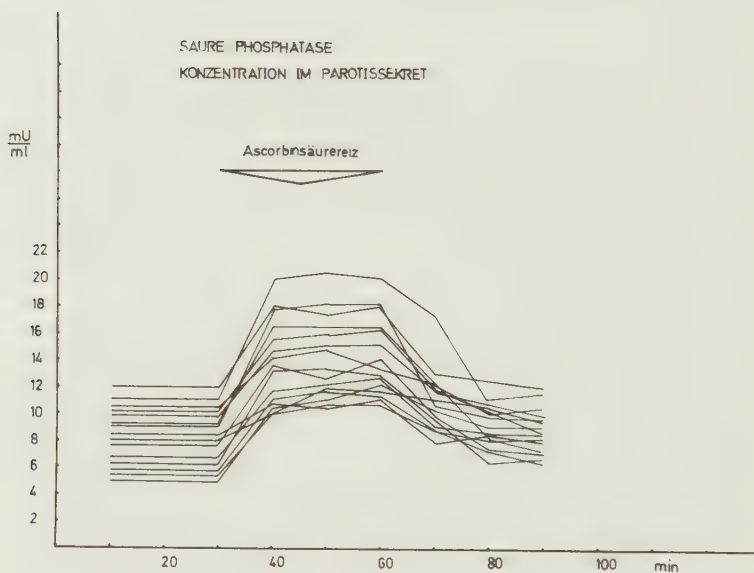


Abb. 3

SAURE PHOSPHATASE
KONZENTRATION IM PAROTISSEKRET

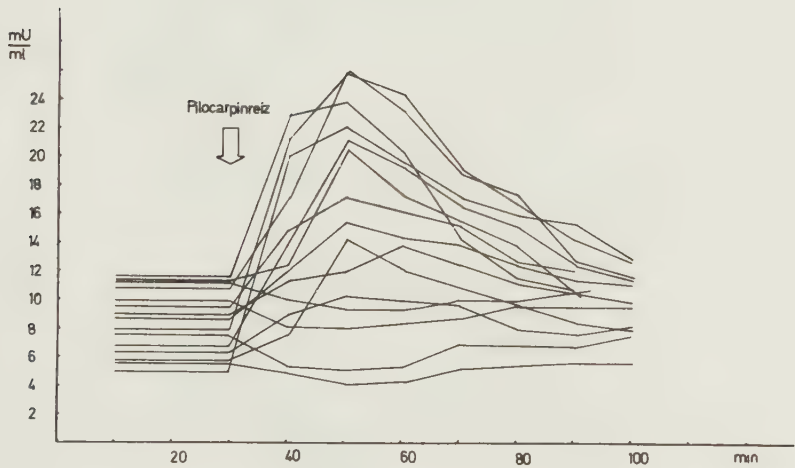


Abb. 4

4. Diskelektrophoretische Auftrennung

a) Gesamtproteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

Diese Standardfärbung für Proteine ergab für alle Proben ein konstantes, jeweils für Ruhe- und Reizsekret typisches Bandenmuster, Unterschiede zwischen den Sekreten der einzelnen Probanden waren nur Modifikationen eines gleichbleibenden Grundmusters. (Abb. 5).

Die Banden wurden vom Auftragungspunkt ausgehend in alphabetischer Reihenfolge mit den Buchstaben a bis j bezeichnet.

Generell bei Reiz wurden die Banden a, b und c schwächer, während sich die Bandengruppe d besonders bei Pilocarpinreiz breiter und dichter darstellte. Die folgende e-Bande zeigte sich variabel, bei Reiz wurde sie meist diffuser und schwächer.

Die auffälligsten Unterschiede zwischen Ruhe- und Reizsekret waren bei den Banden f bis j zu sehen. So wurde bei Reiz die Bande i zur stärksten in diesem Gelbereich, zusätzlich kamen noch die Banden j und j1 hinzu.

Auch die Banden f und g wurden etwas intensiver, während die im Ruhesekret starke h-Bande bei Reiz diffus wurde oder ganz verschwand. (Abb. 6).

Diese reiztypischen Proteinmuster, die bei allen Probanden gefunden wurden, blieben bei Pilocarpinstimulation über ca. 1 Stunde bestehen, bei Ascorbinsäurereiz stellte sich bereits nach 10 Minuten nach Absetzen wieder das Grundmuster ein.

Schemata der Proteinbandenstruktur des
Parotissekretes unter Ruhe und Ascorbin-
säurereiz

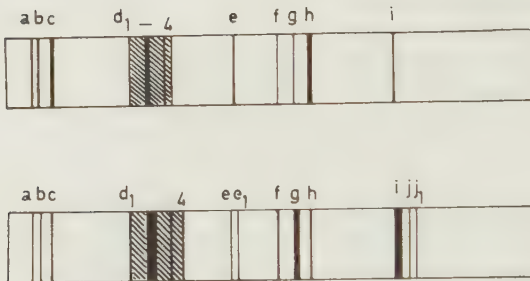


Abb. 5: Das obere Schema stellt das Ruhe-
sekret dar, das untere das Reiz-
sekret. Die Banden sind von der
Kathode zur Anode mit a - j 1 be-
zeichnet. Auffallend ist die Banden-
abschwächung der Banden a, b, c
und die markante Änderung in der
Bandengruppe f, g, h, i und j.

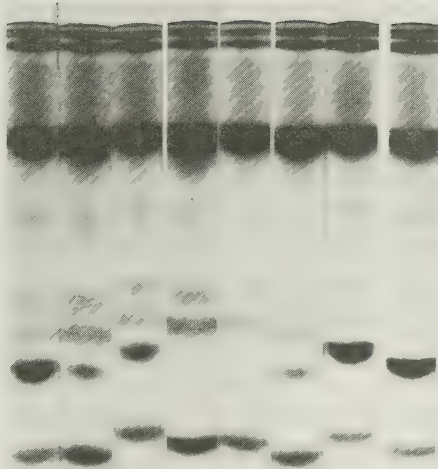


Abb. 6: Von rechts nach links sehen wir zunächst 2 Gele Ruhesekret. Typisch ist die markante h-Bande im Ruhesekret, unter Reiz die mittleren 3 Gele, verschwindet diese h-Bande nahezu völlig (Ascorbinsäurereiz), nach Absetzen des Reizes tritt sie sofort wieder auf.

b) Phosphoproteinfärbung

Die mit dieser Selektivfärbung dargestellten Banden konnten durch Vergleich mit Coomassie-gefärbten Gelen des jeweils gleichen Probanden den Gelbereichen f, g und i zugeordnet werden.

Davon war die i-Bande dominierend. Bei Stimulation, sowohl durch Ascorbinsäure wie durch Pilocarpin, kam es zu einer Intensitätszunahme dieser Bande; häufig kam eine inkonstante j-Bande hinzu. Der Bereich f - g, der generell nur schwach ausgeprägt war, zeigte auf Reiz meist keine Veränderung. Gelegentlich kam es auch zu einer Abschwächung oder zum völligen Verschwinden dieses Bezirks. (siehe Seite 30), (Abb. 7 und 8).

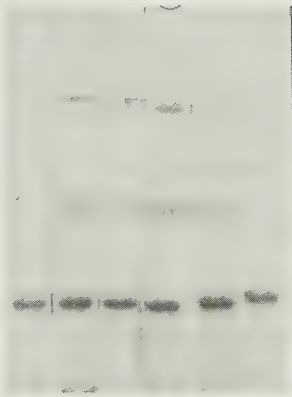


Abb. 7: Glycoproteinfärbung von 7 Parotissekretproben von links nach rechts ein Ruhesekret, 3 Reizsekrete und dann 2 Sekrete nach Absetzen des Reizes.

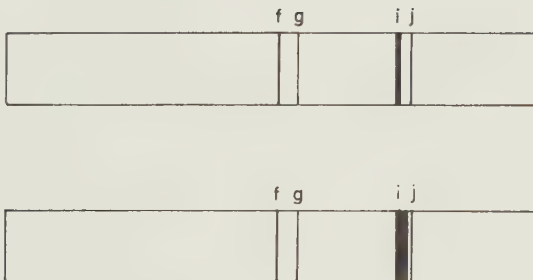


Abb. 8: Schematische Aufzeichnung der Phosphoproteinbanden, links die Kathode, rechts die Anode. Vor allem bei Reiz wird der Bandenbereich i, j, aber auch f, g farbintensiver. Das obere Schema stellt das Ruhesekret dar, das untere Schema

B. Glandula submandibularis

1. Flußraten

Unter Ruhebedingungen wurde eine Sekretion von 0,03 bis 0,5 ml/min./Drüse gemessen. Bei Reiz zeigte die Glandula submandibularis ein Ausscheidungsverhalten, das dem der Glandula parotis analog war:

Unter Ascorbinsäurestimulation kam es zu einer plateauartigen Zunahme auf 0,3 bis 0,9 ml/min./Drüse. Bei Pilocarpinreiz kam es 20 Minuten nach Injektion zu Flußratengipfel bis 1,0 ml/min./Drüse.
(Abb. 9 und 10).

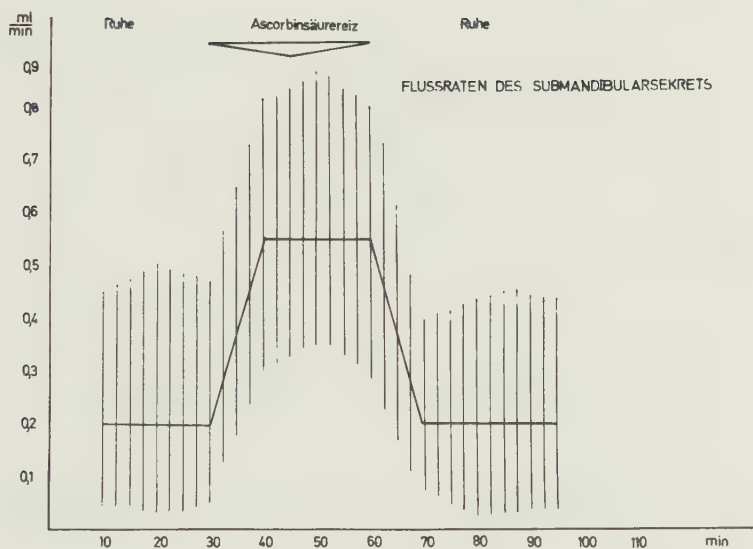


Abb. 9

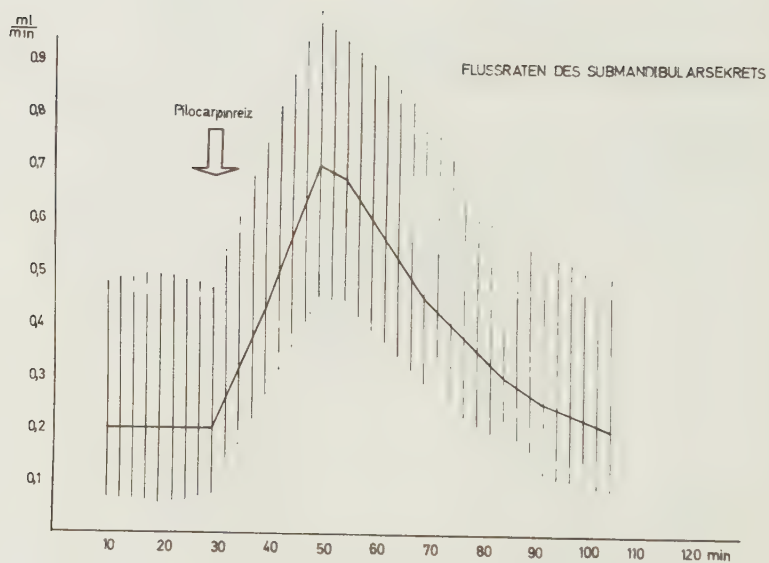


Abb. 10

2. Proteinausscheidung

Die Proteinkonzentrationen lagen bei 0,7 bis 6,7 mg/ml, teilweise lagen auch die Ruhewerte im oberen Konzentrationsbereich. Auf Reiz reagierten dann diese Drüsen bei hohen Ausgangswerten mit einem Absinken oder Gleichbleiben der Proteinkonzentration, während aber die meisten Drüsen bei unteren bis mittleren Ausgangswerten einen Konzentrationsanstieg zeigten. Dabei war die Reizantwort weniger typisch für Ascorbinsäure oder Pilocarpin als das bei den untersuchten Ohrspeicheldrüsen der Fall war.

3. Saure Phosphatase

Unter Ruhebedingungen wurden Konzentrationen an tartrathemmbarer saurer Phosphatase zwischen 2 und 12 mU/ml gemessen.

Auf Ascorbinsäure stiegen die Konzentrationen für die Dauer des Reizes auf Werte zwischen 10 und 15 mU/ml. Nach Pilocarpininjektionen kam es zu Spitzenwerten um 20 mU/ml, jedoch zeigte sich analog dem Reizverhalten der Ohrspeicheldrüsen bei ca. einem Drittel der Fälle ein Konzentrationsabfall, unabhängig von der Höhe des Ruhewertes.

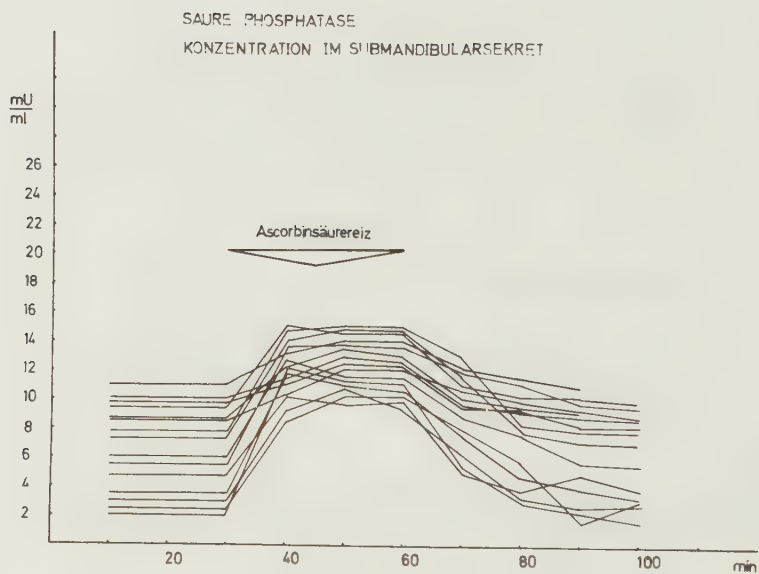


Abb. 11

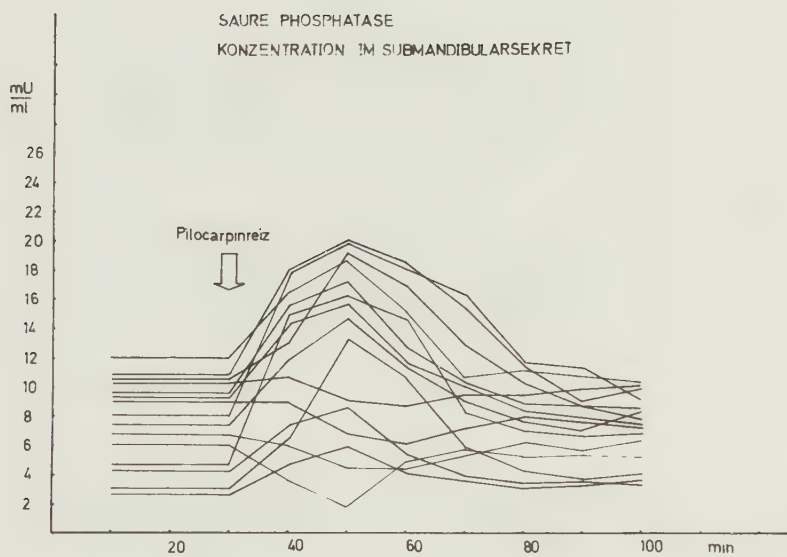


Abb. 12

4. Diskelektrophoretische Auftrennung

a) Gesamtproteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

Die mit Coomassie Brilliant Blue gefärbten Submandibularis-Gele wiesen ein dem der Parotis-Gele analoges Bandenmuster auf. Es kamen allerdings im anodennahen Gelbereich die Banden k und l dazu. Im Gelbereich f-g-h trat unter Ruhebedingungen die h-Bande am deutlichsten hervor, die Banden f und g waren nur schwach ausgeprägt. Die Banden j und i waren beide deutlich ausgebildet. Wie schon bei den Parotis-Gelen waren auch hier die auffälligsten Unterschiede zwischen Ruhe- und Reizsekreten im anodennahen Bereich zu finden. So stellten sich bei Reiz die Banden i, j, k und l besonders deutlich dar, auch die Banden f und l zeigten eine Intensitätszunahme.

Deutlich schwächer wurde die h-Bande. Im Gelbereich zwischen h und i fand sich eine schwach ausgebildete, inkonstante Bande, die, wenn vorhanden, auf Reiz keine Änderung zeigte. (Abb. 13 u. 14).

Schemata der Proteinbandenstruktur des
Submandibularissekrets

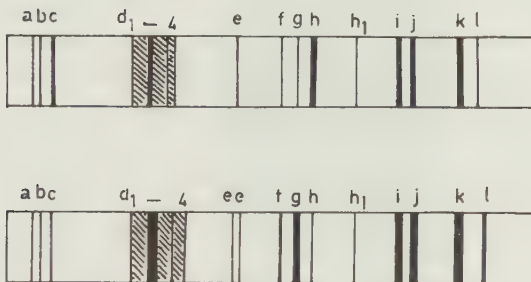


Abb. 13: Die Banden sind von der Kathode zur Anode mit h - l bezeichnet im Gegensatz zum Parotissekret, wo wir im anodennahen Gelbereich die Banden k und l nicht finden, sehen wir diesen Bandenbereich im Submandibularissekret stark ausgebildet. Das obere Schema ist Ruhesekret, das untere Reizsekret.

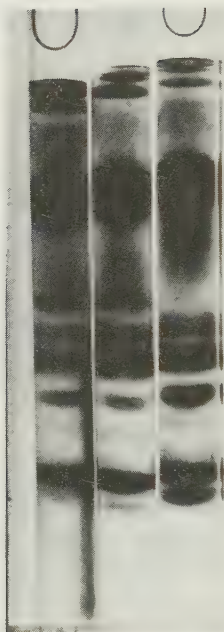


Abb. 14: Die Abb. 14 zeigt 3 Submandibularis-sekrete von links nach rechts. Das linke Sekret Ruhesekret, dann 2 Reiz-sekrete. Es ist deutlich wie die mit i, j, k und l bezeichneten Banden kräftiger werden. Die unmittelbar an der Kathode liegenden Banden jedoch schwächer.

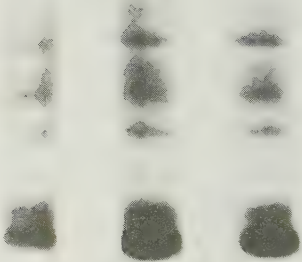
b) Phosphoproteinfärbung

Als phosphathaltig ließen sich die Banden f bis k identifizieren. Von diesen am deutlichsten ausgeprägt waren die Banden i und j. Bei Stimulation, unabhängig von der Reizart, war eine deutliche Intensitätszunahme im Gelbereich i - j zu beobachten, während alle übrigen phosphathaltigen Banden mit einer mäßiggradigen B-Verstärkung reagierten. Im Gegensatz zur Parotisdrüse scheidet die Submandibularisdrüse wesentlich mehr und auch differente phosphorylierte Proteine aus, während wir bei der Parotisdrüse im Sekret zwei Banden phosphorylierte Proteine feststellen können, sind es bei der Submandibularisdrüse 6 - 7 deutlich differente Proteine. (siehe Abb. 15 u. 16).

Abb. 15: Phosphoproteinsäure.

Submandibularissekret.

Das linke Gel Ruhesekret,
mittleres und rechtes Gel
Reizsekret. Bei Reiz wer-
den vor allem die Banden i, j,
aber auch die übrigen inten-
siver.



f g h h₁ i j k



f g h h₁ i j k



Abb. 16: Schema der Phosphoproteinbanden im Submandi-
bularissekret. Links die Kathode, rechts die
Anode.

V. Diskussion

=====

Ossifikationsstörungen der Zähne, Peridontopathien und Karies stehen in enger Beziehung zum Calcium-Phosphor-Stoffwechsel. Neben dieser lokalen Bedeutung wurde bereits eingangs auf die Rolle des Phosphatstoffwechsels im Verdauungsvorgang hingewiesen.

Nachdem in bisher vorliegenden Untersuchungen das Ausscheidungsverhalten an anorganischem Phosphat zusammen mit Flußraten, Protein- und Phosphatasekonzentrationen untersucht wurde (BENEDEK-SPÄT, EGGERS und LURA, KREUSSER), sollte nun geklärt werden, in welchem Zusammenhang die Sekretion der sauren Phosphatase mit der Sekretion an organischen Phosphaten und Phosphoproteinen steht.

Die von uns gemessenen Werte bei der Phosphatasenbestimmung lagen deutlich höher als die bisher beschriebenen Phosphataseaktivitäten (BENEDEK-SPÄT). Die meisten Untersucher bezogen sich jedoch auf Speichel, außerdem wurden jeweils verschiedene Bestimmungsmethoden zur Phosphatasebestimmung verwandt. Wahrscheinlich ist die Differenz der verschiedenen hohen Phosphatasenaktivitäten auf die rasche Inaktivierung der Phosphatase zurückzuführen. BENEDEK-SPÄT z.B. arbeitete mit tief gefrorenen Proben.

Bei unseren Untersuchungen stellte sich heraus, daß nur die sofortige Bestimmung aussagekräftig ist. Sowohl bei Lagerung im Kühlschrank als auch nach Einfrieren und Wiederauftauen und am schnellsten bei Zimmertemperaturlagerung sinkt die Phosphataseaktivität im Sekret rapide ab.

Das Reizverhalten der untersuchten Parotis- und Submandibularisdrüsen war uneinheitlich, es zeigte sich aber, besonders deutlich bei gustatorischer Stimulation, eine deutliche Tendenz zur Konzentrationszunahme bei Reiz. Die absolute Menge an pro Zeiteinheit sezerniertem Enzym lag jedoch aufgrund der höheren Flußraten bei Reiz in allen Fällen um ein mehrfaches der bei Ruhe gemessenen Werte.

Auffallend dazu war das Verhalten der Phosphoproteinausscheidung. Unter Reiz kam es zu einem deutlichen Anstieg an Phosphoproteinen. Da sowohl die Phosphatasen sowie die Phosphoproteine von Azinuszellen sezerniert werden, kann ein direkter Zusammenhang zwischen beiden Proteinen hergestellt werden. Beide Proteine sind drüsenspezifische Proteine, wie auch die Amylasen. Daß heißt diesen Proteinen kommt eine Aufgabe zu in der Mundhöhle. Während die Amylase Verdauungsfunktion hat, könnten die phosphorylierten Proteine für den Zahnstoffwechsel wichtig sein, bzw. auch noch unbekannte Aufgaben haben.

Bemerkenswert ist dabei, daß der Submandibularisdrüse der weit wichtigere Anteil in der Sekretion von phosphorylierten Proteinen zukommt. Wir finden im Submandibularissekret 6 - 7 Banden phosphorylierter Proteine, im Parotissekret dagegen nur 2 - 3 Banden.

Auf der anderen Seite ist die Amylasemenge, die in der Submandibularis sezerniert wird, weit geringer als in der Parotis, sie beträgt nur etwa ein Drittel der in der Parotis sezernierten Menge.

Nach SEIFERT kann saure Phosphatase eindeutig im Ergastoplasma der Azinuszellen nachgewiesen werden. Bei Reiz kommt es neben der Flußratensteigerung, Elektrolyt- und Eiweißkonzentrationsänderung auch zu einer Verschiebung des pH-Wertes von pH 5,7 bis pH 7,8 infolge der vermehrten Bicarbonatsekretion.

Dementsprechend könnte die saure Phosphatase unter Reizbedingungen nicht mehr im optimalen Bereich arbeiten und somit ein vermehrtes Erscheinen von phosphorylierten Proteinen im Sekret resultieren. Eine Abhängigkeit der Phosphataseausscheidung bzw. der Phosphoproteinausscheidung vom Serumphosphatasespiegel, der bei allen Probanden im Normbereich lag, war nicht festzustellen.

Bei den phosphorylierten Proteinen handelt es sich im Gegensatz zu den Immunglobulinen und der Amylase um relativ niedermolekulare Proteine, da sie vor und nach der Albuminbande auftreten, d.h. ein Molekulargewicht zwischen 80 und 40000 haben könnten. In weiteren Untersuchungen ist zu klären, welcher Art diese Proteine sind und welche Aufgabe sie haben, da sie speicheldrüsenspezifisch sind und zum Großteil in der Submandibularisdrüse gebildet werden.

VI. Zusammenfassung

=====

Bei einem Normalkollektiv von 44 Probanden wurde das Verhalten der großen Kopfspeicheldrüsen unter Ruhe- und Reizbedingungen bezüglich ihrer Proteinausscheidung untersucht. Unter Berücksichtigung der Gesamtproteinausscheidung sollte dabei das Sekretionsverhalten der phosphorylierten Proteine und der sauren Phosphatasen untersucht werden.

So wurde unter standardisierten Sekretabnahmebedingungen zur Quantifizierung aller im Sekret vorhandenen Proteine die Biuret-Methode angewandt, während mit Hilfe der Diskelektrophorese und anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blue die Auftrennung des Gesamtproteins in Fraktionen erfolgte. Durch eine Selektivfärbung wurde ein Teil der Proteinfractionen als Phosphoproteine identifiziert. Der Gehalt an saurer Phosphatase wurde enzymatisch bestimmt.

Die untersuchten Parotis- und Submandibularisdrüsen zeigten unterschiedliche Reaktionsweisen auf gustatorischen Reiz durch Vitamin C und auf pharmakologischen Reiz durch Pilocarpin. Die jeweilige Reizantwort war typisch für die Art der Stimulation und der Drüse. Unter Miteinbeziehung der höheren Flußraten bei Reiz kam es jedoch in allen Fällen zu einer Zunahme der Ausscheidung an Gesamtprotein pro Zeiteinheit.

Bei uneinheitlichem Reizverhalten von Gl. Submandibularis und Gl. Parotis bezüglich der Aus-

scheidung an saurer Phosphatase war doch eine Tendenz zur Konzentrationszunahme festzustellen, die absolute, pro Zeiteinheit sezernierte Enzymmenge war in allen Fällen größer als unter Ruhebedingungen.

Spezifische Drüsenproteine sind die Phosphoproteine. Sie wurden bislang noch nicht in Speicheldrüsensekreten beschrieben. Es finden sich unterschiedliche Phosphoproteinfraktionen im Submandibularis- und Parotissekret. Dabei kommt der Submandibularis in der Sekretion phosphorylierter Proteine die Hauptaufgabe zu. Sie produziert 6 - 7 nachweisbare Phosphoproteine im Gegensatz zur Parotis, wo in der Regel 2 Phosphoproteinbanden regelmäßig nachweisbar sind. Das Molekulargewicht dieser Proteine liegt zwischen ca. 80 und 40000, da sie sich um die Albuminfraktion gruppieren.



LITERATUR

BENEDEK-SPÄT, E.: The Composition of Stimulated Human Parotid Saliva, Archs oral Biol. 18 (1973) 1091.

-----: The Composition of Unstimulated Human Parotid Saliva, Archs oral Biol. 18 (1973) 39.

CACDWELL, R. C., PIGMAN, W.: Disc Electrophoresis of Human Saliva in Polyacrylamide Gel, Archives of Biochemistry and Biophysics 110 (1965) 91-96.

CUTTING, J. A., ROTH, T. F.: Staining of Phospho-Proteins on Acrylamide Gel Elektropherograms, Analytical Biochemistry 386 (1973) 53.

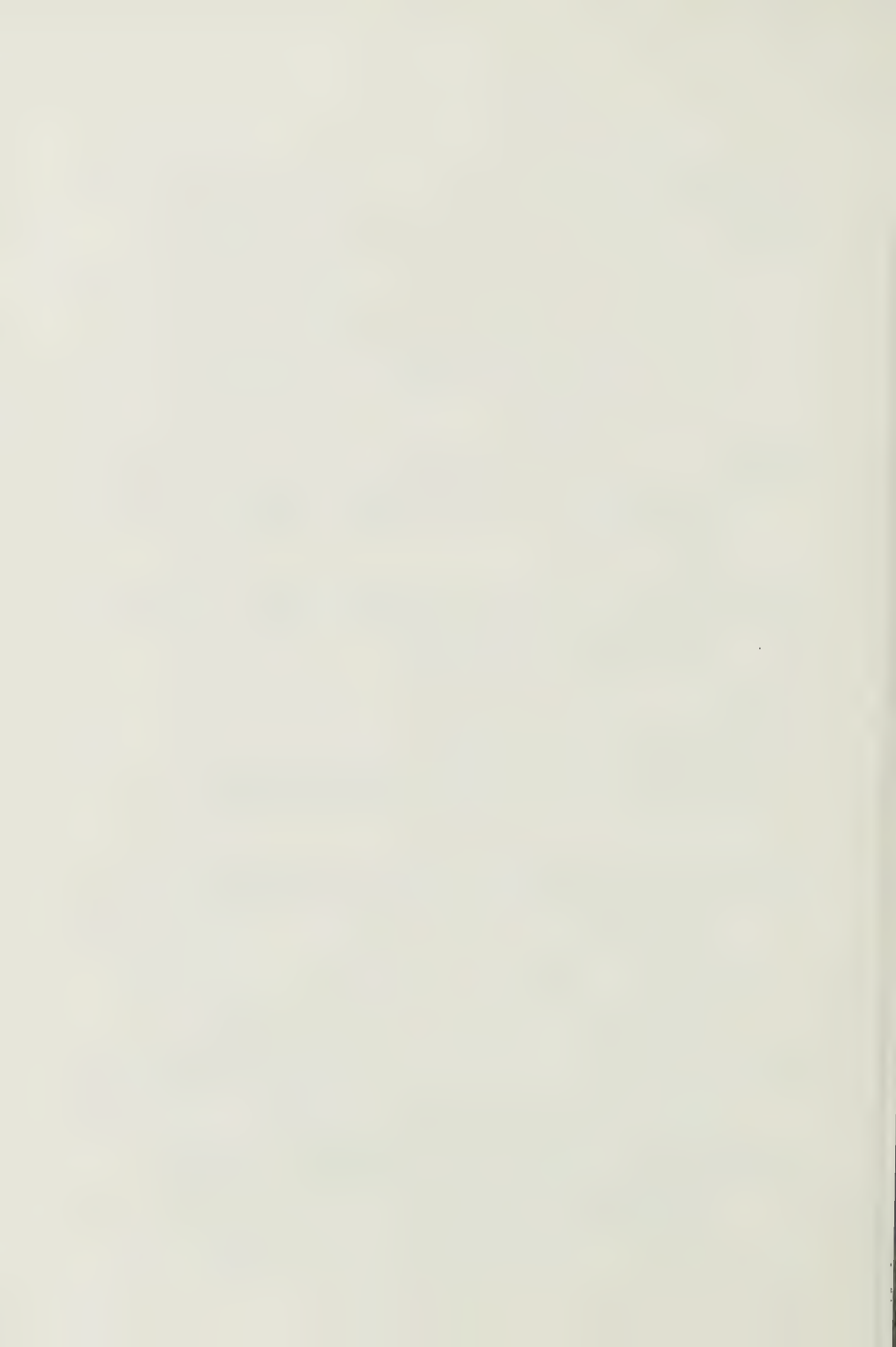
EICHNER, H., MÜNDEL, M., BRETZEL, G.: Vergleichende Untersuchungen von Flußraten, Elektrolyt- und Gesamteiweißgehalt und diskelektrophoretische Auftrennung des Sekretes an fraktioniert gewonnenem menschlichen Parotissekret, Z. Laryng. Rhinol. 54 (1975) 19.

EICHNER, H., EICHNER, V., MÜNDEL, M., HOCHSTRASSER, K.: Simultanbestimmungen von Lysozym- und Immunglobulin A-Gehalt von menschlichem Parotissekret im Vergleich zu Flußrate und Gesamtproteinausscheidung bei fraktionierter Ruhe- und Reizabnahme, Z. Laryng. Rhinol. 54 (1974) 554.

EICHNER, H., MÜNDEL, M., BRETZEL, G., HOCHSTRASSER, K.: Vergleichende Untersuchungen der Proteinfractionen von menschlichem Parotissekret mittels ein- und zweidimensionaler Immunelektrophorese, Immunodiffusion und Diskelektrophorese, Laryng. Rhinol. 54 (1975) 105-113.

- ERICSON, S., WIBERG, A.: The Secretory Rate of the Human Submandibular Glands in Response to Parasympathicomimetik and Gustatory Stimulation, Archs oral Biol. 17 (1972).
- FELDBERG, W., J.A. GUIMARAIS: Some observations on salivary secretions, J. Physiol. 85 (1935) 15.
- GRON, P.: The State of Calcium and Inorganic Orthophosphate in Human Saliva, Archs oral Biol. 18 (1973).
- HANSON, H.: Zusammensetzung und Funktion des Speichels, Dt. zahnärztl. Z. 16 (1961).
- HAY, D. J., GIBBONS, R. J., SPINELL, D.M.: Characteristics of some high molecular weight constituents with bacterial aggregating activity from whole saliva and dental plaque, Caries Res. 5 (1971) 111.
- HAY, D.J.: The isolation from human parotid saliva of a tyrosine-rich acidic peptide, which inhibits high affinity for hydroxyapatite surfaces, Arch. oral Biol. 18 (1973) 1531.
- HAY, D. J.: The interactions of human salivary proteins with hydroxyapatite. Arch oral Biol. 18 (1973) 1517.
- HOCHSTRASSER, K. u. a.: Isolierung und Charakterisierung eines Proteaseninhibitors aus menschlichem Bronchialsekret, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 (1972) 28.
- KREUSSER, W.: Mono- and Divalent Electrolyte Patterns, PCO_2 and pH in Relation to Flow Rate in Normal Human Parotid Saliva, Vol. 2, No. 6, 1972.
- LEUINE, M. J., ELLISON, S. A.: Immuno-Electrophoretic and Chemical Analysis of Human Parotid Saliva, Archs oral Biol. 18 (1973).

- MAURER, H. R.: Diskelektrophorese, Walter de Gruyter, Berlin, 1968.
- MEYER, P., NÜRNBERGER, E.: Zur Sekretion von Amylase und saurer Phosphatase durch die Parotis des Menschen vor und nach gustatorischer Stimulation unter Berücksichtigung der Enzymkonzentration und der Enzymsekretionsrate, Laryng. Rhinol. 53 (1974) 223-229.
- MEYER, P., VOGT, K., KLEBER, R.-R.: Zur Beeinflussung der Proteine des Parotisspeichels durch Alter und Geschlecht, Dt. Zahn- Mund- und Kieferheilkunde 60 (1973) 6.
- MÜNDEL, M.: Die Biochemie der menschlichen Speicheldrüsenkrankungen in Arch. f. Ohr-Nas.-Kehlkopf-Heilkunde Bd. 213 (1976).
- RAUCH, S.: Die Speicheldrüsen des Menschen, Thieme, Stuttgart, 1959.
- : Zur Physiologie und Pathophysiologie der menschlichen Speicheldrüsen, Genf, 1960.
- SECKER, J.: The humoral control of the secretion by the submaxillary gland of the cat following chorda stimulation, J. Physiol. 81 (1934) 81.
- SREEBNY, L. M., MEYER, I.: Salivary glands and their secretions (Pergamon Press New York 1964).
- WEISS, G.: Diagnostische Bewertung von Laborbefunden, J.F. Lehmanns Verlag, München, 1976.
- WERLE, E., P. v. RODEN: Über das Vorkommen von Kallikrein in den Speicheldrüsen und im Mundspeichel, Biochem. Zeitschr. 286 (1936) 213.



LEBENS LAUF

- 1948 am 21.1. in Eschenbach/Oberpfalz
 geboren als Sohn des Polizeibeamten
 Georg Mair und seiner Ehefrau Magdalena
- 1954 Eintritt in die Volksschule Dingolfing
- 1958 Übertritt an das Gymnasium Dingolfing
- 1967 Abitur am Gymnasium Dingolfing
- 1967 - 69 Ableistung des Grundwehrdienstes
- 1969 Beginn des Medizinstudiums an der Universität
 München
- 1977/78 Staatsexamen an der Universität München
- 1978/79 Medizinalassistentenzeit
 am Kreiskrankenhaus Altötting (Chirurgie)
 am Städt. Krankenhaus München-Harlaching
 (Gynäkologie)
 an der Med. Klinik der Universität München
- 1979 Erteilung der Approbation
- 1980 Beginn der Ausbildung in der Fachrichtung
 Anästhesie als Assistenzarzt am Kreis-
 krankenhaus Altötting
- seit 1982 Fortsetzung der Ausbildung am Anästhesiolo-
 gischen Institut der Universität München

